

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Ezüst és arany nanopartikulumok *in vitro* toxicitásának vizsgálata coelomasejteken

OTDK- dolgozat

Készítette: Bodó Kornélia

biológus MSc hallgató

Témavezető: Dr. Engelmann Péter

PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés, irodalmi áttekintés	4
2.1. <i>A nanorészecskék tulajdonságai</i>	4
2.2. <i>A nanorészecskék, mint potenciális környezeti szennyezőanyagok</i>	4
2.3. <i>Nanotoxikológiai kutatások gerinctelen modellszervezetek alkalmazásával</i>	5
2.4. <i>A gerinctelenek, mint immunológiai modellszervezetek</i>	6
2.5. <i>Az Eisenia fajok immunrendszere</i>	6
2.6. <i>A coelomasejtek csoportosítása</i>	7
2.7. <i>A humorális komponensek csoportosítása</i>	7
3. Célkitűzések	9
4. Anyagok és módszerek.....	10
4.1. <i>Kísérleti állatok tartása</i>	10
4.2. <i>Coelomasejtek izolálása</i>	10
4.3. <i>Sejtek kezelése</i>	10
4.4. <i>Sejtek életképességének meghatározása</i>	10
4.5. <i>Sejtszintű kaszpáz aktivitás vizsgálata</i>	11
4.6. <i>Áramlási citometria</i>	11
4.7. <i>Lizátum készítése</i>	11
4.8. <i>Szuperoxid dizmutáz (SOD)-zimográfia</i>	11
4.9. <i>Comet-assay</i>	11
4.10. <i>Statisztikai analízis</i>	12
5. Eredmények	13
5.1. <i>E. andrei coelomasejtek életképesség vizsgálata NP kezelést követően</i>	13
5.2. <i>E. fetida coelomasejtek életképesség vizsgálata NP kezelést követően</i>	16
5.3. <i>A SOD aktivitás vizsgálata zimográfiával</i>	19
5.4. <i>Sejtszintű kaszpáz aktivitás vizsgálata E. andrei coelomasejteken</i>	21
5.5. <i>Sejtszintű kaszpáz aktivitás vizsgálata E. fetida coelomasejteken</i>	22
5.6. <i>AgNP kezelt E. andrei coelomasejtek DNS károsodása (Comet assay)</i>	24
6. Megbeszélés.....	26
7. Összegzés	30
8. Irodalomjegyzék.....	31
9. Köszönetnyilvánítás	35

1. Rövidítések jegyzéke

AgNP- ezüst nanopartikulum

AuNP-arany nanopartikulum

CCF- Coeloma Citolitikus Faktor

LMA-Low Melting Agarose (alacsony olvadáspontú agaróz gél)

NBT- Nitro Blue Tetrazolium

NMA-Normal Melting Agarose (normál olvadáspontú agaróz gél)

NP-nanopartikulum

ROI-reaktív oxigén intermedierek

TEMED- Tetramethyl-ethylene-diamine

7-AAD-7-amino actinomycin D

2. Bevezetés, irodalmi áttekintés

2.1. A nanorészecskék tulajdonságai

A nanotechnológia egy újdonsült tudományág, amely egy teljesen új korszak hírnökének, vagy a következő ipari forradalom úttörőjének tekinthető (HANSEN ÉS MTSAL. 2008). Ez a technológia magában foglalja az atomi, molekuláris és makromolekuláris területeken történő kutatásokat és fejlesztéseket, melyekben az alkotóelemeket nanométeres skálán értelmezzük. A különféle nano-méretű anyagok hajlamosabbak a kémiai reakciókra, különböző erősségű vagy eltérő elektromos tulajdonságaik révén mobilisabbak lehetnek a nagyobb méretű, hasonló anyagoknál. Az Európai Bizottság 2011. október 18-án a következőképp határozta meg a nanopartikulumok fogalmát: természetes, esetlegesen gyárilag előállított anyagok, melyek a partikulumokat oldott vagy aggregált állapotban tartalmazzák, méretük egy vagy több dimenziós skálán 10 és 100 nm közötti tartományban mozog. A fém-NP-ok a legelterjedtebb kereskedelmi és orvosbiológiai nano-termékek (pl. sebkötöző anyagok, gyógyszeradagolók). Számos kereskedelmi és gyárilag előállított termékről elmondható, hogy NP-okat tartalmaz. Gyártásuk és használatuk rendkívül gyorsan növekszik, a 2004-es becslések szerint a globális szintű előállításuk és használatuk több ezer tonnára volt tehető, és 2020-ra már el fogja érni a fél millió tonnát. Így biztosnak mondható, hogy a nanotermékek melléktermékei is kikerülnek a környezetbe (ROBICHAUD ÉS MTSAL. 2009, STENSBERG ÉS MTSAL. 2011).

2.2. A nanorészecskék, mint potenciális környezeti szennyezőanyagok

Az ipari és mezőgazdasági tevékenységek révén megnövekedett szennyezőanyagok károsak lehetnek nemcsak a környezetre, de a közegészségre is. A NP-ok előállítása egy elektronikus-galvanikus eljárás keretein belül történik meg, így könnyebben szívódnak fel a szervezetben apró részecskék formájában. Ebből kifolyólag akár még alacsony koncentrációban is hatóképesnek tekinthetők a szervezet egyensúlyának felborítására, az életfolyamatokat negatív irányba való befolyásolására. Méretük és esetlegesen más anyaggal való borítottságuk nagymértékben meghatározza a reaktivitásukat, transzportjukat, és toxicitásukat. A nanotoxikológiai tanulmányokban kitüntetett szerephez jutnak a baktériumok és a gerinctelenek, mivel az anyagok környezetünkbe kerülése esetén, ezek a szervezetek az elsők között találkozhatnak a nanorészecskékkel (MAURER-JONES és mtsai 2009).

2.3. Nanotoxikológiai kutatások gerinctelen modellszervezetek alkalmazásával

Az ökonanotoxikológiai irodalom az Ag, a TiO₂, ZnO, Si és szén alapú (pl. fullerének) nanotermékeket helyezi a központba.

A NP-ok hatásainak kutatásánál a talajlakó és a vízi szervezetek is jelentős szerepet kapnak. Kedvelt modellállat a *Mytilus* (tengeri kagyló), melynek hemocytáit vizsgálták *in vitro* C₆₀, TiO₂, SiO₂ NP-kezeléseket követően. Az eredmények alapján ezeknek a NP-oknak hatására nem mutatható ki szignifikáns citotoxicitás, de lizozim, oxigén-gyökök, és NO produkció révén immun-, és gyulladásos folyamatok indulnak be (CANESI ÉS MTSAL. 2010).

HECKMANN ÉS MTSAL (2011) gyűrűsférgeken *in vivo* vizsgálták a leginkább toxikusnak nyilvánított inorganikus NP-ok (Cu, Au, Ag, Ti, Zn, Si, Al), és ezek szabad ionjainak hatásait. Az AgNP, CuNP és TiO₂-NP a reprodukciós képességben okozott toxicitást. További, *in vitro* toxicitási tesztekkel bizonyították, hogy *Eisenia fetida* gilisztafajban a TiO₂ (10-20nm) jelenléte mitokondriális károsodást, *in vivo* a ZnO (10-20nm) NP-ok pedig a bélsejtek károsodását idézi elő. A Ti és Zn bioakkumulációja 7 nap után következett be, a ZnO sokkal erősebb toxikus válasz kiváltására képes, mint a TiO₂ (HU ÉS MTSAL. 2010). A C₆₀ fullerén hatását vizsgálták *in vivo* és *in vitro* *Lumbricus rubellus*-ban és *E. venata*-ban is. *In vivo* tanulmányokkal szövetkárosodást mutattak ki, amely azonban megnövekedett immunválasz nélkül következett be (VAN DER PLOEG ÉS MTSAL. 2011).

A legtöbb tanulmány azonban az AgNP-ok toxicitásának vizsgálatával foglalkozik (KWAK ÉS MTSAL. 2013). Az AgNP-okat kereskedelmi szempontból széles körben alkalmazzák, a háztartásokban is megtalálhatók, antimikrobiális hatásuk miatt számos gyógyászatban használatos termék alapanyaga. Az AgNP bioakkumulációja gyűrűsférgeknél relatíve alacsonynak mondható (COUTRIS ÉS MTSAL. 2012), azonban több fiziológiai jellemzőre van hatással a már 100 mg/kg száraz talaj alatti NP-mennyiség, pl. enzim-aktivitás-fokozódás (HU ÉS MTSAL. 2012), oxidatív stresszválasz (TSYUSKO ÉS MTSAL. 2012), és szöveti apoptózis (LAPIED ÉS MTSAL 2010) figyelhető meg. Az AgNP akkumulációja az *E. andrei* faj coelomafolyadékában a lizoszómális aktivitás fokozódását váltotta ki (KWAK ÉS MTSAL. 2010).

Korlátozott számban állnak rendelkezésünkre tanulmányok a NP-ok immunfolyamatokat befolyásoló *in vivo* és *in vitro* hatásairól. Munkánk során a nagyobb hangsúlyt az AgNP *in vitro* *E. andrei* immunológiai kompetens sejtjeire (un. coelomasejtek) gyakorolt hatásainak tanulmányozása kapta. Az AgNP hatásainak vizsgálata

mellett az AuNP toxikus hatásaival is foglalkoztunk. Az AuNP-okat is egyre szélesebb körben alkalmazzák gyógyászati termékek alapanyagaként, használatával kapcsolatban számos kutatás folyik. Korábbi tanulmányokban megfigyelték, hogy az AuNP képes szétesztódni a szöveteken keresztül, mely folyamat nagymértékben függ a NP méretétől és formájától (UNRINE ÉS MTSAL. 2010).

2.4. *A gerinctelenek, mint immunológiai modellszervezetek*

Egy gerinctelen állat testfelépítését és életfolyamatait vizsgálva módunkban áll megismerni a filogenezis folyamatait, általánosan előforduló, evolúciósan ősi jelenségek alapjait tárhatjuk fel, amelyek különböző fejlettségi szinten lévő állatcsoportokban is előfordulnak.

Számos gerinctelen modellállatot alkalmaznak a veleszületett immunitás elemzésekor, remélve, hogy részletesebben megismerik a gerincesek komplex immunrendszerének kezdeti lépéseit. A gerinctelen állatok relatíve könnyen szaporíthatóak, a laboratóriumi tartásuk könnyű, és felhasználásuk nem ütközik szigorú etikai akadályokba. Az előbbi okok, szintén alátámaszthatják a gerinctelen modellállatok kísérletes felhasználását. Továbbá, a gerincteleneknél felfedezett aktív immunmechanizmusok jóval összetettebbek, mint azt korábban feltételezték (pl. az antimikrobiális peptidek termelése, koaguláció, fagocitózis és az enkapszulációs reakciók összehangolt működése) (COOPER ÉS MTSAL. 2002). Szintén nem régen vált ismertté, hogy a gerinctelen állatokban felfedezett mintázat felismerő receptorok konzervált és speciális (gerinceseknél kevésbé ismert) jelátviteli útvonalakat is működésbe hozhatnak (ENGELMANN ÉS MTSAL. 2011).

2.5. *Az Eisenia fajok immunrendszere*

A kevésértéjű gyűrűsférgeket (alosztály: Oligochaeta) elsősorban a környezeti toxikológiai kísérletekben alkalmazzák. A kísérletes felhasználás magyarázható azzal, hogy a talajlakó giliszták magas nehézfém-rezisztenciával rendelkeznek, illetve a nehéz-fémionok időleges tárolására és inaktiválására is képesek (DEMUYNCK ÉS MTSAL. 2007; CALISI ÉS MTSAL. 2009). A törzsfajlás során ebben a gerinctelen állatcsoportban figyelhetjük meg először a celluláris és a humorális immunválasz együttes működését (BILEJ ÉS MTSAL. 1995). A humorális immunfolyamatok nagy része a coelomafolyadékban zajlik, a coelomafolyadék proteolitikus, hemolitikus, antibakteriális, és citolitikus tulajdonságokkal (ld. 1. táblázat) rendelkezik (BILEJ ÉS MTSAL. 2000; COOPER ÉS MTSAL. 2002). Az oligochaeta gyűrűsférgek coelomafolyadéka molekuláris elemek mellett celluláris komponenseket is tartalmaz, az un.

coelomasejteket. Ezek a sejtek morfológiailag és funkcionális szempontból is analógiát mutatnak a gerincesek fehérvérsejtjeivel. Ezen sejteknek több típusát különböztetjük meg. A coelomasejtek multifunkcionálisak, immunválaszban betöltött szerepük elsősorban a fagocitózisban nyilvánul meg.

2.6. A coelomasejtek csoportosítása

A coelomasejtek számos funkcióval rendelkeznek, amelyek közül a legfontosabbak a sejt-sejt felismerés és a fagocitózis. A sejtek leszármazási vonalai részleteiben nem tisztázottak, több kutató úgy véli, hogy a sejtek a coelomaüreg epitheliális vonalából származnak, tehát az epitheliummal kapcsolatban álló speciális struktúrákból erednek.

Számos, az Oligochaeta rendbe tartozó fajnak vizsgálták már a coelomasejtjeit (pl: *E. veneta*, *A.chlorotica*), azonban tényleges szerepükre vonatkozó legtöbb adat a földigilisztából (*L. terrestris*) és trágyagilisztából (*E. fetida*) származik (ADAMOWICZ 2005, KUREK ÉS MTSAL. 2007). A coelomasejtek kategorizálása kezdetben klasszikus mikroszkópos módszerekkel történt (COOPER ÉS STEIN 1981, VALEMBOIS ÉS MTSAL. 1992), a ma használatos, egyszerűbb csoportosítás alapján (áramlási citometria és monoklonális ellenanyagok felhasználása) a coelomasejteknek -eredetük és morfológiájuk alapján- két nagyobb alpopulációja különíthető el. Ezek az amöbociták (hialin és granuláris) és az eleociták. A granuláris amöbociták, hialin amöbociták a celluláris immunmechanizmusok (fagocitózis és enkapszuláció) résztvevői, míg az eleociták (amik megegyeznek szabad chloragogén sejtekkel) hozzájárulnak a homeosztázis fenntartásához és főként a humorális immunmechanizmusokban vesznek részt (ENGELMANN ÉS MTSAL 2005, ENGELMANN ÉS MTSAL. 2011).

2.7. A humorális komponensek csoportosítása

A gyűrűsférgek humorális immunválaszának tanulmányozásakor különleges figyelmet szenteltek a szekretált citolitikus komponenseknek. A coelomafolyadék citolitikus hatása általánosan bizonyított gerinces erythrocytákon (BILEJ ÉS MTSAL. 2000). A haemolizinek többsége haemagglutinációs tulajdonsággal bír, azonban bakteriosztatikus hatással is rendelkeznek (VALEMBOIS ÉS MTSAL. 1982). A humorális immunválasz többnyire a fenoloxidázok/peroxidázok (VALEMBOIS ÉS MTSAL. 1991), lizozim (LASSALLE ÉS MTSAL. 1988), agglutinin (STEIN ÉS COOPER 1988), és a fetidin szintézisével zajlik (ROCH ÉS MTSAL. 1981; MILOCHAU ÉS MTSAL. 1997). A coeloma citolitikus faktor (CCF) nem régen vált ismertté, mint a coelomafolyadék mintázat felismerő funkcióval rendelkező molekulája.

Molekula neve	Funkció	Molekula súly	Termelőds	Előfordulás
Fetidinek (1 és 2)	- haemolitikus peroxidáz aktivitás - kötődés a sphingomyelinhez, lízist indukál - bakterosztatikus, mennyiségük nő a patogén baktériumok beinjektálása után	40 kDa 45 kDa	Chloragocyták	- coelomafolyadék
Lysenin	- simaizom összehúzóds patkányoknál - kötődés a sphingomyelinhez, lízist indukál - membránkárosítás	41 kDa	Coelomasejtek	- coelomafolyadék
Eisenia-pore (EP)	- citolitikus aktivitás - kötődés a sphingomyelinhez (vvt-kgalaktosyl-ceramidjához kötődik, lízist indukál)	38 kDa	Coelomasejtek	-coelomafolyadék
Hemolysinek (H1, H2, H3)	- lízis és agglutináció (haemolízis)	46 kDa 43kDa 40 kDa	Coelomasejtek	-egész állatban
CCF	- profenol-oxidázkaszkád aktiválás - daganatsejtek lízise - opszonizáció	42 kDa	Coelomasejtek	-chloragogén szövet a bélfalban

1. táblázat: Antimikrobiális és citolitikus hatású proteinek *E. fetida*-ban (BILEJ ÉS MTSAI, 2000)

3. Célkitűzések

Számos gerinctelen fajban vizsgálták már a különböző NP-ok toxikus hatásait. A giliszta coelomasejtek AgNP és AuNP expozícióra adott biológiai válaszreakcióiról még viszonylag kevés ismeret áll a rendelkezésünkre. Munkánk során feltételeztük, hogy a giliszta immunsejtek, mint primér makrofág-szerű sejtek, képesek a NP-k gyors felvételére, bekebelezésére ebből kifolyólag érzékenyen reagálnak az NP-ok toxikus hatásaira. A tervezett kísérletek során célul tűztük ki:

1. Különböző koncentrációjú (1,25µg-40µg/ml) és időtartamú (4 és 24 óra) AgNP ill. AuNP *in vitro* kezeléseket követően az elpusztult sejtek arányának megállapítását
2. Az előző mérésekkel párhuzamosan a coelomasejtek kaszpáz aktivitásának vizsgálatát.
3. Reaktív oxigén intermedierek termelődése kapcsán szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimaktivitás vizsgálatát zimográfia alkalmazásával.
4. A DNS-károsodás közvetlen becslését Comet-assay-vel.
5. A különböző gilisztafajokból (*E. andrei* és *E. fetida*) származó coelomasejtek túlélésének összehasonlítását a NP koncentrációk függvényében.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti állatok tartása

Kísérleteink során ivarérett trágyagilisztákat használtunk fel (*Eisenia andrei*, és *E. fetida*, Subclassis: Oligochaeta, Phylum: Annelida). Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Általános Állattani Tanszékén 1985-óta fenntartott tenyészetből szereztük be, a tartásuk standard laboratóriumi körülmények (hőmérséklet: $20 \pm 1^\circ\text{C}$, folyamatos légsere, napi 12 órás megvilágítás, a tenyésztalaj összetétele: 50% hansági tőzeg és 50% lótrágya, nedvességtartalma ~60%) között történt. A kísérletek megkezdése előtt 48 órával a kiválogatott állatokat csapvízzel nedvesített papírvattára helyeztük át, amíg bélcsatornájukból a talajszemcsék kiürültek. A kísérlet kezdete előtt az állatokat csapvízzel öblítettük le, hogy semmilyen szennyeződés ne kerüljön az izoláló pufferbe.

4.2. Coelomasejtek izolálása

A coelomasejteket izoláló puffer (71,2 mM NaCl, 5 mM EGTA, 50,4 mM guaiacolglycerylether, 5 %-os ethanol, pH: 7,3) segítségével izoláltuk. Az alkoholtartalmú izoláló puffer hatására a giliszták a dorzális pórusokon kibocsátják a coelomasejteket tartalmazó coelomafolyadékot. Ezek után a mintákat LBSS-sel (71,5 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,1mM MgSO_4 , 0,4 mM KH_2PO_4 ; 0,3 mM NaH_2PO_4 ; 4,2mM NaHCO_3 ; pH:7,3) kétszeres térfogatúra hígítottuk, és centrifugáltuk (1000 rpm/5perc), majd a felülúszót leöntöttük. Az élő coelomasejtek számát tripánkéék festékkizárási teszttel határoztuk meg.

4.3. Sejtek kezelése

A coelomasejtek izolálása után a sejteket médiumban vettük fel (RPMI, 1% FCS, 1% penicillin), majd a számolás után 5×10^5 - $2,5 \times 10^6$ sejtet (a kísérletes assay-tól és mintaszámtól függően) kezeltünk NP-okkal (AgNP-AuNP 10 nm). Vizsgálataink során a kezelések különböző koncentrációkban (1,25 μg -40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) és különböző időtartamban (4 és 24 óra) zajlottak. A kezelés után a sejteket PBS-ben mostuk, majd további kísérleteinkben használtuk fel.

4.4. Sejtek életképességének meghatározása

A különböző időtartamú kezeléseket követően a sejteket (10^5 db) PBS-ben mostuk, majd centrifugáltuk (1000 rpm/5perc). A felülúszó leöntését követően a sejtekhez 7-amino-actinomycin D (Biotium, 7-AAD, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nukleinsav festéket adtunk, és áramlási citometriával mértük a mintákat.

4.5. Sejtszintű kaszpáz aktivitás vizsgálata

A különböző időtartamú kezeléseket követően a sejteket (10^5 db) mostuk, majd centrifugáltuk (1000 rpm/5perc). A felülúszó leöntését követően a sejteket LBSS-ben reszuszpendáltuk, majd ehhez adtuk hozzá a fluoreszcens caspase 3 szubsztrátot (Biotium, Nucview 488 caspase 3 substrate). A 30 perc inkubáció után a sejteket LBSS-sel hígítottuk, és áramlási citometriával mértük.

4.6. Áramlási citometria

Az adatgyűjtéshez FACSCalibur (BD) típusú áramlási citométert használtunk, az adatok kiértékelését az FCSEXPRESS (DeNovo) szoftverrel végeztük.

4.7. Lizátum készítése

A coelomasejtek izolálásának (ld. anyag és módszer 4.2. alfejezet) és kezelésének (ld. anyag és módszer 4.3. alfejezet) folyamata az előbb leírt módon történt. A felülúszó leöntése után a sejteket lizálópufferben (0,5% Triton X-100, 50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH: 7,6) vettük fel. Proteázgátlók (Protease Inhibitors mix, Sigma Aldrich, 1µg/ml) jelenlétében homogenizáltuk (4 °C, 15 perc) a coelomasejteket. Majd a centrifugálás után (13000 rpm/10 perc) a sejttörmeléktől megszabadultunk.

4.8. Szuperoxid dizmutáz (SOD)-zimográfia

A zimográfia alapja a natív poliakrilamid gélelektroforézis. A futtató gél akrilamid koncentrációja 7,5 %, a szeparáló gélé 4%. A sejtek kezelése (AuNP: 20 µg/ml, AgNP 5µg/ml, H₂O₂ 20 µl/ml) 24 óráig tartott, majd a lizátum készítése után a minták futtatásra kerültek. A futtatást 105-110V-on jégen végeztük (futtató puffer: 125mM Tris-HCl, 1,23M Glycine, 0,5% SDS, pH 8,3). A futtatás ideje 90-120 perc volt. Az elektroforézis után a gél renaturáltuk (2,5% Triton X-100 (3x 10 perc), majd 30 percig sötétben, 2,45 mM NBT-oldatban (75% N,N-dimethylformamid) tartottuk, ez a kromogén szubsztrát a szuperoxid-anionok detektálására. Ezt követően a gél egy 36 mM KH₂PO₄ puffer (pH: 7.8) alapú 28 µM riboflavint és 28 mM TEMED-et tartalmazó oldatba került. A zimográfiák denzitometriás analízisét ImageJ2x program segítségével végeztük el.

4.9. Comet-assay

A sejteket izoláltuk, majd a NP-kal 24 órás kezelést hajtottunk végre. Vizsgálatainkat sötétben végeztük, hogy az UV-sugárzás hatását kizárjuk. Munkánk során a szendvics-agaróz gél struktúrát alkalmaztuk, amely azt jelenti, hogy két különböző olvadáspontú gél három rétegben vittük fel a maratott tárgylemezre. Az első réteg 0,5%-os PBS-ben hígított NMA

(normál olvadáspontú agaróz gél) (150 μ l) volt, amit 5-10 perc alatt szobahőmérsékleten hagytuk megszilárdulni. A második réteg a PBS-ben oldott 0,5%-os (37 Celsius fokos vízfürdőben tartott) LMA (alacsony olvadáspontú agaróz gél) (75 μ l) volt, amit összekevertünk a sejtekkel ($2,5 \times 10^6$ db/ml,) ezek után 20 percig állni hagytuk. A harmadik réteg ismét LMA (75 μ l) volt, amely már nem tartalmazott sejteket. Minden egyes réteg felvitelét követően, a még folyékony gélre egy nagyméretű fedőlemezt helyeztünk, mellyel elértük a gél egyenletes szétterülését. A harmadik réteg LMA megszilárdulása után a tárgylemezek egy nagy koncentrációjú sóoldatba, úgynevezett lizáló oldatba kerültek (1 % Na-szarkozinát, 2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10mM-Tris, 1 % Triton X- 100, 10 % DMSO), fénytől védve, egy óráig ott tartottuk (4 °C-on). Ennek az volt a célja, hogy a nukleinsav másodlagos szerkezete részben szétváljon, így pedig lehetővé váljon a DNS fragmentek vándorlása az agaróz gélben. A lízis elvégzése után elvégeztük az elektroforézist lúgos körülmények között. A tárgylemezeket az elektroforézishez frissen készített pufferbe (200 mM EDTA, 10 N NaOH, pH:10) helyeztük, és a futtatókádban 20 percig állni hagytuk, majd 40 percig sötétben futtattuk (0,46V/cm, 136 mA). A futtatás után a tárgylemezekre neutralizáló oldatot (0,4 M Tris, pH: 7.5) cseppentettünk (3x5perc) és végül etídium-bromiddal festettük (50 μ l). Fluoreszcens mikroszkóppal 400 x-os nagyítással vizsgáltuk a sejteket. Megfelelő számítógépes program alkalmazásával a mikroszkópban készített sejtekről felvételeket készítettünk, melyeket későbbiekben a program (Comet assay IV. Perceptive Instruments Ltd.) segítségével elemezni tudtunk. Az elemzés során végpontként a „fej” és a „csóva” intenzitásának arányát, a „tail moment”-et (TM) határoztuk meg, és ezekkel végeztünk statisztikai elemzést. Minél nagyobb károsodást szenvedett a sejt, annál kisebb méretű lesz a feji, és annál nagyobb a csóva (üstökös) része. Az ép sejtek gömb alakúak maradnak.

4.10. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzés céljára a Microsof Excel és a Microcal Origin (Microcal Software Inc., Northhampton, MA, USA) programot alkalmaztuk.

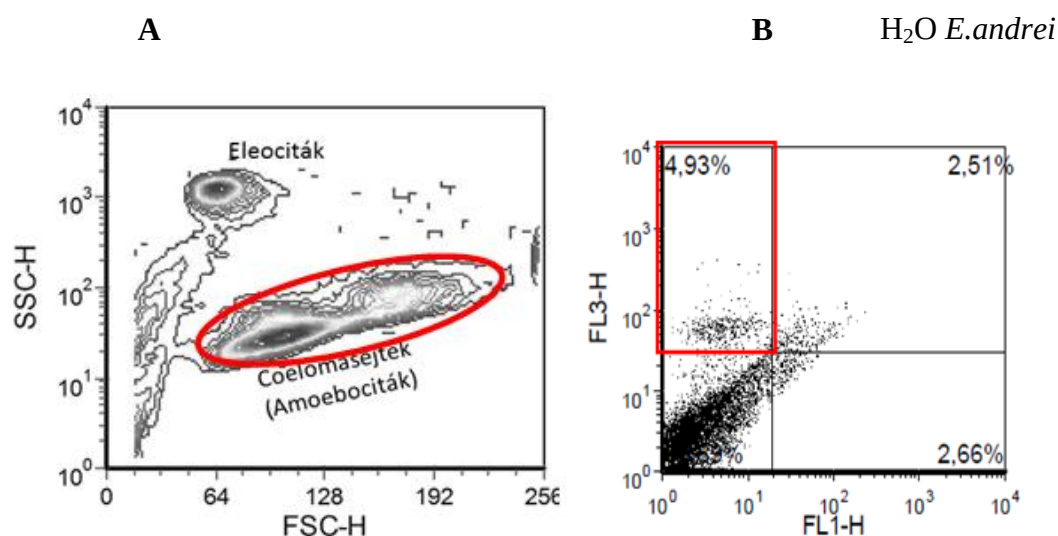
Az eredmények ábrázolásakor az átlagokat és a standard hibasávokat tüntettük fel. A kezelések hatásainak elemzését Student-féle (kétmintás, egyenlő varianciájú) t-tesztel, illetve három, vagy több értéksor összehasonlítása esetén ANOVA és post-hoc analízis segítségével végeztük. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. Eredmények

5.1. *E. andrei* coelomasejtek életképesség vizsgálata NP kezelést követően

Elsőként *E. andrei* fajból származó coelomasejtek életképességét vizsgáltuk áramlási citometriával 24 órás *in vitro* NP kezeléseket követően.

Az izolált coelomasejtek egy kevert populációt alkotnak, jelen vizsgálatainkban az effektor coelomasejtekre, az amoebocitákra koncentráltunk (**1A. ábra**). Minden mérésünkhöz több negatív kontrollt készítettünk, ezekből egyet kiválasztottunk, az eredményt az alábbi dot-blot szemlélteti (**1B. ábra**).

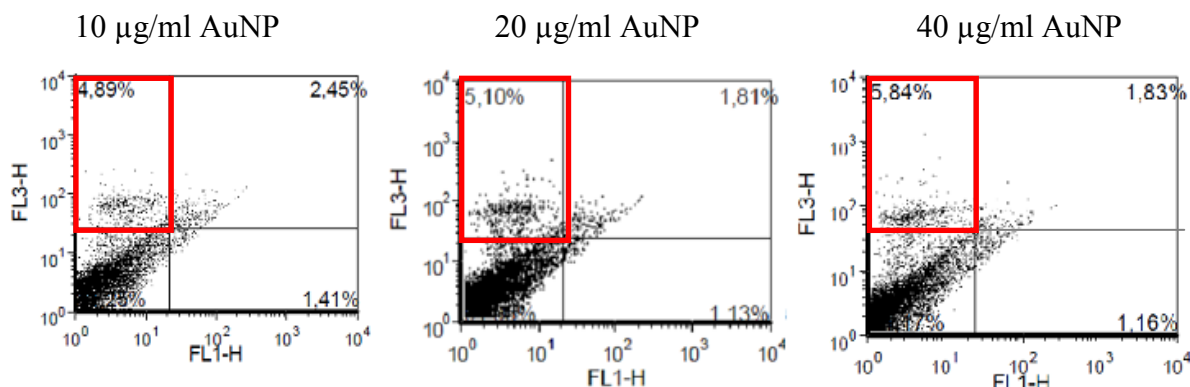


1.A ábra: A coelomasejteket fizikai paraméterek alapján (nagyság és granularitás) több alcsoportra oszthatjuk, kísérleteinkben az amoebociták populációjával foglalkoztunk. Az eleociták esetében a magas autofluoreszcencia megnehezíti a fluoreszcens markerek adatainak (pl. nukleinsav festék felvétele esetében az élő/halott sejtek) objektív értékelését.

1.B ábra: *E. andrei* coelomasejtek vitalitása a kontroll mintában (7AAD festés). Reprezentatív példa három mérésből.

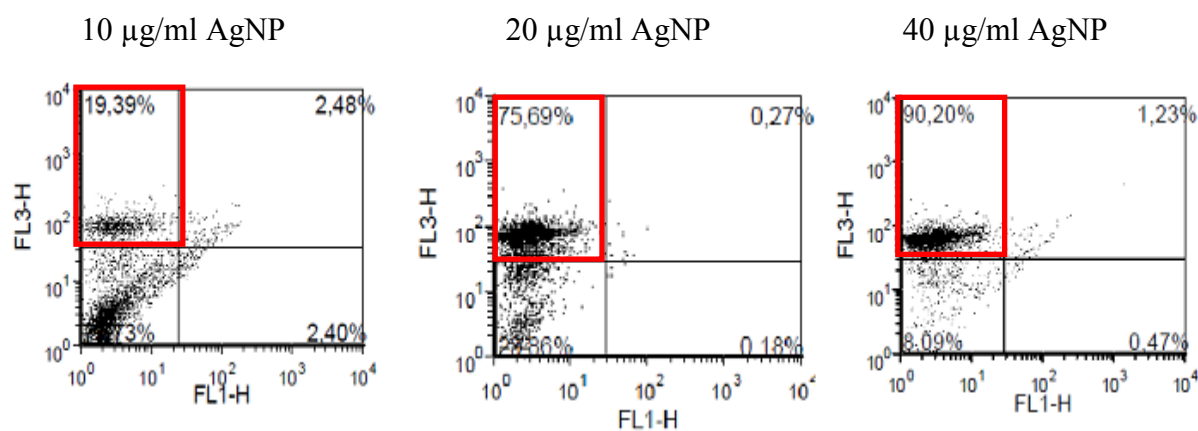
A dot-ploton látható, hogy a 24 órás kezelést követően a negatív kontrollban a sejtek 4,93 %-a pusztult el. Negatív kontrollként a tápoldat-sejtek keverékéhez steril desztillált vizet adtunk, ugyanabban a térfogatban, melyben a legmagasabb NP koncentrációt (40 μ l) alkalmaztuk (**1B. ábra**).

Az AuNP-val való inkubációt is ugyanolyan koncentrációkban végeztük el, mint az AgNP-kezeléseket, előzetes tanulmányok alapján tisztában voltunk azzal, hogy az AuNP kevésbé toxikus, mint az AgNP (**2. ábra**).



2. ábra: Sejtek vitalitása 24 órás AuNP kezelést követően (*E. andrei*). Reprezentatív minták 3 mérésből.

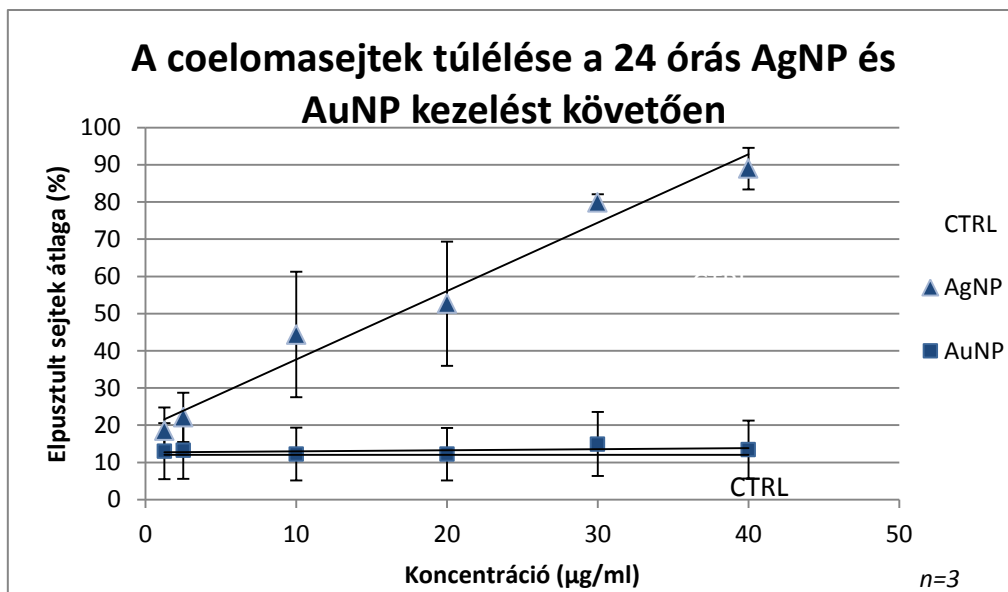
Az AuNP kezelés (24 óra, 10 µg/ml) hatására a sejtek 4,89 %-a, míg a 20 µg/ml-es AuNP kezelés következtében a sejtek 5,10%-a pusztult el (2. ábra). A 40 µg/ml AuNP a sejtek 5,84 %-ának pusztulását okozta. Itt meg kell említenünk, hogy a sejteket alacsonyabb koncentrációkkal is kezeltük, azonban ott nem tapasztaltunk változást a kontrollhoz (1B. ábra) képest, amely ezeknél a koncentrációknál is minimálisnak mondható.



3. ábra: Sejtek vitalitása 24 órás AgNP kezelést követően (*E. andrei*). Reprezentatív minták 3 mérésből.

A 24 órás 10 µg/ml-es AgNP hatására a sejtek 19,39 %-a, míg a 20 µg/ml-es AgNP kezelés következtében a sejtek 75,69%-a pusztult el (3. ábra). A 40 µg/ml AgNP a sejtek 90,20 %-ának pusztulását okozta, tehát a pusztulás a koncentráció növekedésével arányosan változott.

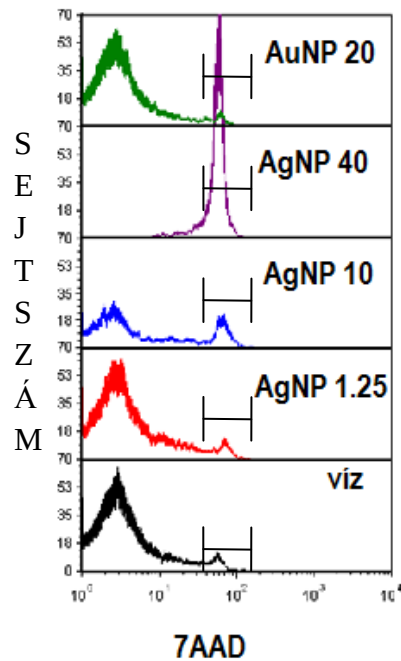
Méréseink átlagát egy közös grafikonon ábrázoltuk (1. grafikon). A grafikon alapján elmondhatjuk, hogy az AuNP-kezelés hatására nem következett be lényegesen nagyobb sejtpusztulás a kontrollhoz képest.



1. grafikon: A coelomasejtek túlélése 24 órás AgNP és AuNP kezelést követően (n=3, átlag ± SEM).

Az AgNP esetében azonban koncentrációfüggő toxicitást tapasztaltunk (**1. grafikon**), a sejtek fele (LD50) körülbelül a 15-20 µg/ml-es AgNP kezelés hatására pusztul el. A 30 µg/ml-es kezelés a sejtek kb. 80%-ának, a 40 µg/ml-es kezelés pedig kb. a sejtek 90%-ának pusztulását okozta.

A mérési eredmények jobb szemléltetéséhez a koncentrációkat, ahol nagyobb toxicitást tapasztaltunk közös hisztogramon ábrázoltuk (**4. ábra**). Kisebb koncentrációban a kezelés még nem okozott jelentősebb változást.

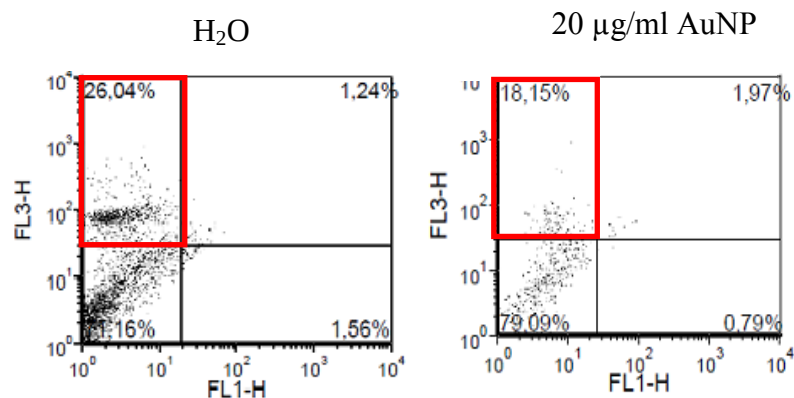


4. ábra: A NP kezelt *E. coli* sejtök 7-AAD felvétele (a grafikonon a koncentrációk mellett a $\mu\text{g/ml}$ nincs feltüntetve)

A 10^0 - 10^1 közötti tartomány szemlélteti az élő sejteket. A koncentrációk növelésével, látható, hogy az élő sejtek aránya fokozatosan csökken. A 7-AAD fluoreszcencia (10^2 körüli tartomány), pedig arányosan emelkedik az elpusztult sejtek mértékével. Különbséget a negatív kontroll és az AuNP kezelt minták között nem láthatunk.

5.2. *E. coli* sejtök életképesség vizsgálata NP kezelést követően

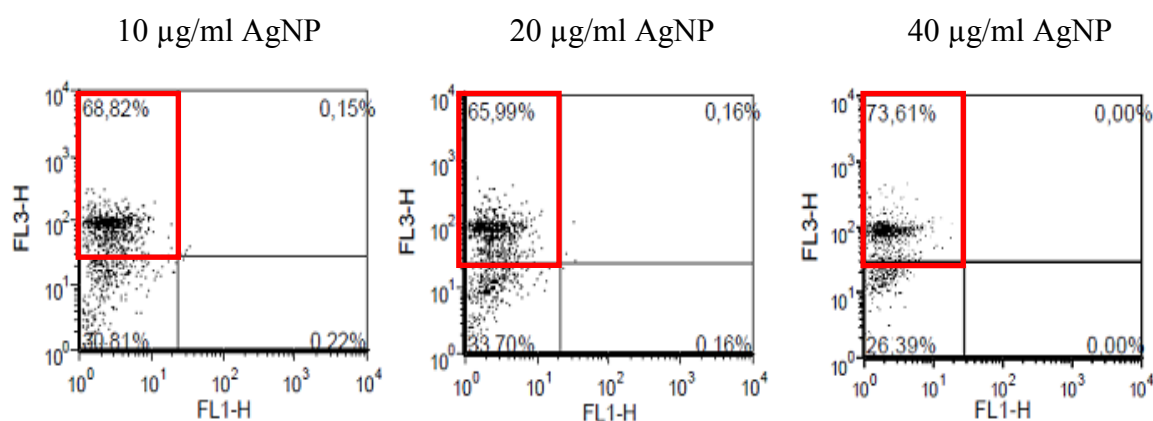
Hasonlóan az előzőekhez az *E. coli* sejtök esetében is több különböző koncentrációjú NP kezelést alkalmaztunk.



5. ábra: Coelomasejtek vitalitása negatív kontroll (H_2O) és AuNP kezelést követően (*E. coli*).

Reprezentatív minta 3 mérésből.

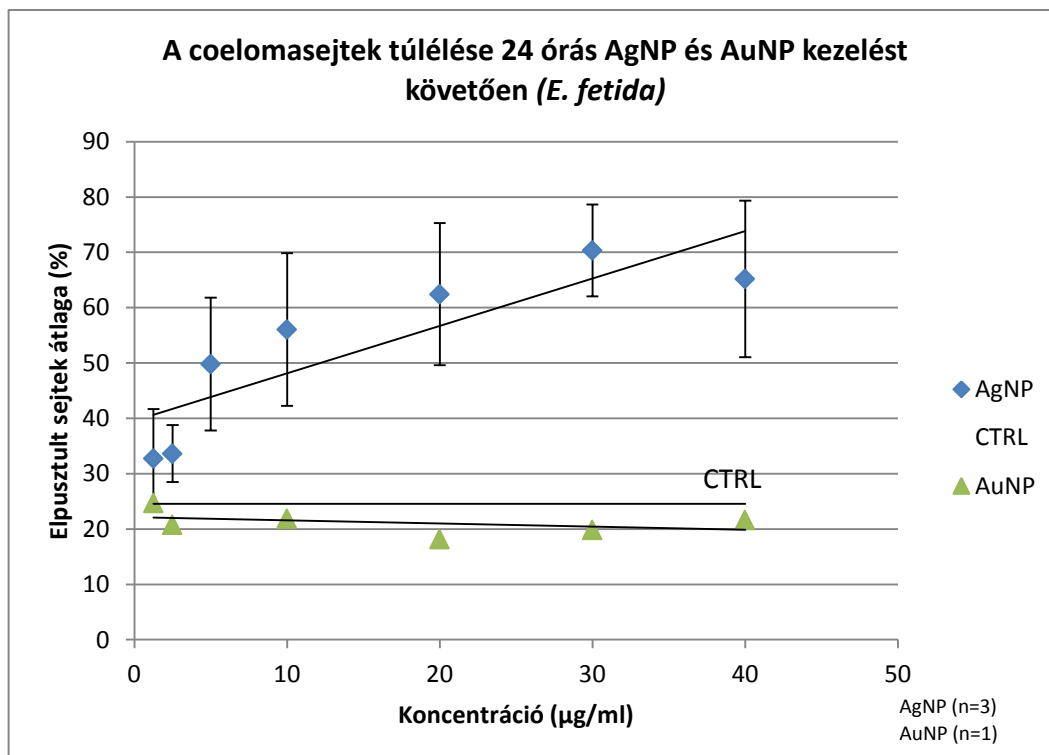
A negatív kontrollban (**5. ábra**) a coelomasejtek 26,04%-a pusztult el. A steril desztillált víz itt is akkora térfogatban került a tápoldat-sejtek keverékéhez, mint amekkora a legmagasabb NP koncentráció volt (40 µl). A 20 µg/ml AuNP hozzáadása a sejtek 18,15 %-ának pusztulását okozta (**5. ábra**). A három független 20 µg/ml-es AuNP kezelésnél az elpusztult sejtek átlaga 26,55 %, amely nem sokkal haladta meg a negatív kontrollnál (H₂O) bekövetkezett sejtpusztulást (24,55 %).



6. ábra: Sejtek vitalitása 24 órás AgNP kezelést követően (*E. fetida*). Reprezentatív minták 3 mérésből.

A 24 órás 10 µg/ml-es AgNP kezelés (**6. ábra**) hatására a sejtek 68,82 %-a, míg a 20 µg/ml-es AgNP kezelés következtében a sejtek 65,99 %-a pusztult el. A 40 µg/ml-es AgNP kezelés a sejtek 73,61 %-ának pusztulását okozta.

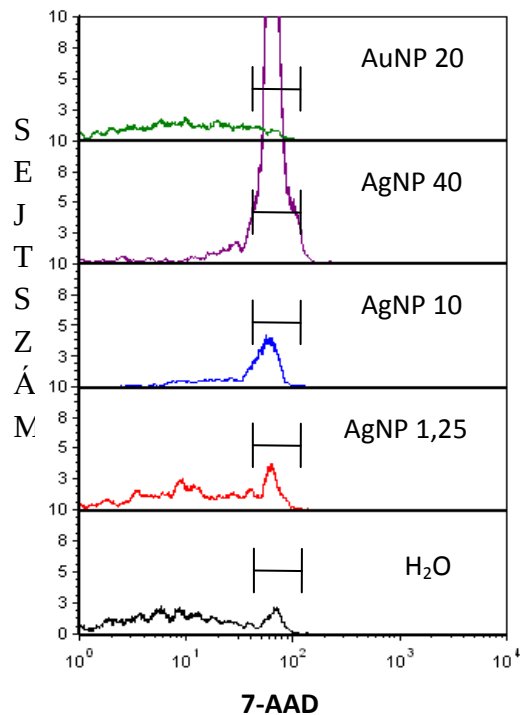
Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az *E. fetida* coelomasejtek annak ellenére, hogy a 40 µg/ml-es AgNP-kezelés nem okozott olyan mértékű sejtpusztulást, mint az *E. andrei* esetében, de érzékenyebben reagálnak az AgNP-kezelésre. A negatív kontroll alkalmazásánál is nagyobb mértékű volt az elpusztult *E. fetida* coelomasejtek aránya, mint az *E. andrei* coelomasejteké.



2. grafikon: Az *E. fetida* coelomasejtek túlélése 24 órás AgNP és AuNP kezelést követően (AgNP n=3, átlag $\pm$ SEM).

Az összesített *E. fetida* coelomasejtes túlélési adatokat grafikonon ábráztuk (2. grafikon). Az AgNP esetében koncentrációfüggés tapasztalható, azonban a sejtek 50%-a már az 5 µg/ml-es kezelés következtében elpusztult, ez nagyobb érzékenységre utal az *E. andrei* coelomasejtekhez képest. A legnagyobb pusztulás a 30 µg/ml-es kezelést követően következett be, a 40 µg/ml-es koncentráció nem volt akkora hatással a sejtekre, mint *E. andrei* esetében, valószínűleg azért, mert addigra a sejtek nagy része már elpusztult. Az *E. fetida* negatív kontroll mintánál is nagyobb mértékű sejtpusztulást tapasztaltunk, mint az *E. andrei* negatív kontroll mintájánál. Az AuNP-nak nem volt hatása a sejtek életképességére a kontrollhoz képest (5. ábra és 2. grafikon).

Hasonlóan az *E. andrei* adatokhoz itt is a jobb szemléltetés véget a nagyobb toxicitású koncentrációkat közös hisztogramon ábráztuk (7. ábra).

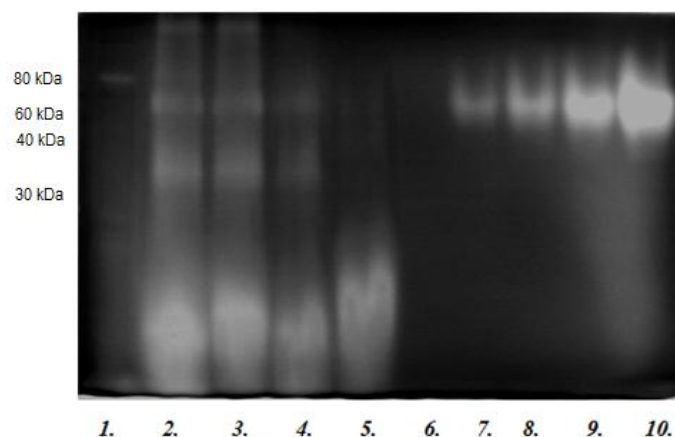


7. ábra: A NP kezelt *E. fetida* coelomasejtek 7-AAD felvétele (a grafikonon a koncentrációk mellett a $\mu\text{g/ml}$ nincs feltüntetve)

A 10^0 - 10^1 közötti tartomány szemlélteti az élő sejteket. A koncentrációk növelésével ez a csúcs eltolódik a 10^2 érték felé, itt már az elpusztult sejtek láthatók. Összehasonlítva a 4. és a 7. ábrát a két külön fajból származó coelomasejtek közötti különbségek jól látszanak.

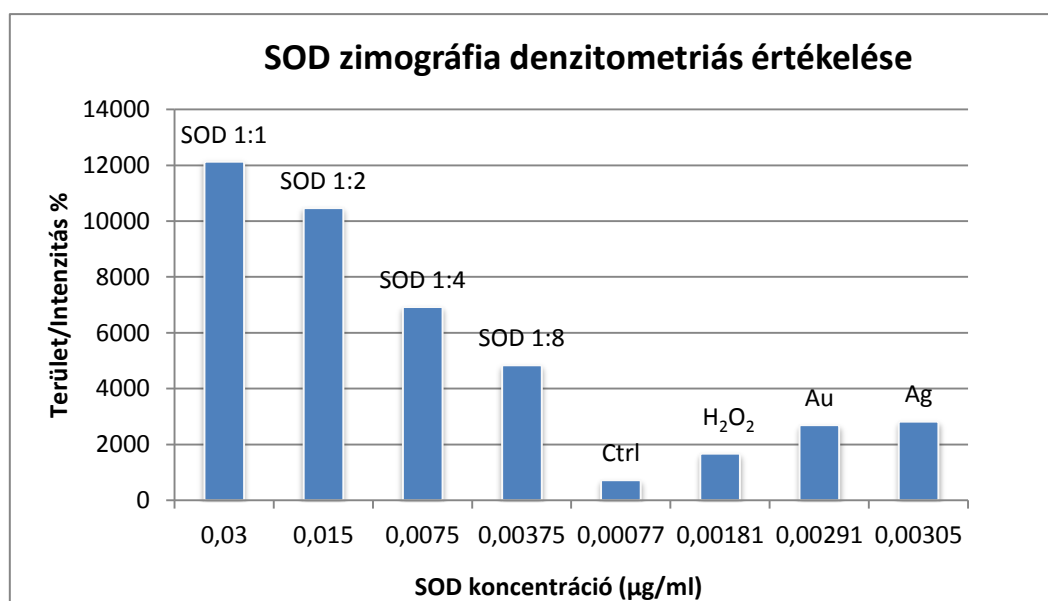
5.3. A SOD aktivitás vizsgálata zimográfiával

A vizsgálatot *E. andrei* fajból származó coelomasejtekkel végeztük. A sejteket 24 óráig kezeltük a NP-okkal, utána lizátumot készítettünk. A lizátum fehérjekomponenseit natív gélelektroforézis alkalmazásával választottuk el. A NP kezelés során egy köztes koncentrációt ($5 \mu\text{g/ml}$ -es AgNP-koncentrációt) alkalmaztunk, mert az életképesség vizsgálat során $10 \mu\text{g/ml}$ -es kezelésnél már egy nagyobb mértékű sejtpusztulást figyeltünk meg. Az AuNP-esetén a $20 \mu\text{g/ml}$ -es koncentrációt választottuk, mert ott már emelkedett az elpusztult sejtek aránya az élőkhöz képest. A bekebelezett NP-ok sejtbe jutásakor ROI-k képződnek, melyeket a SOD enzim semlegesít, vagy alakít át H_2O_2 -á.



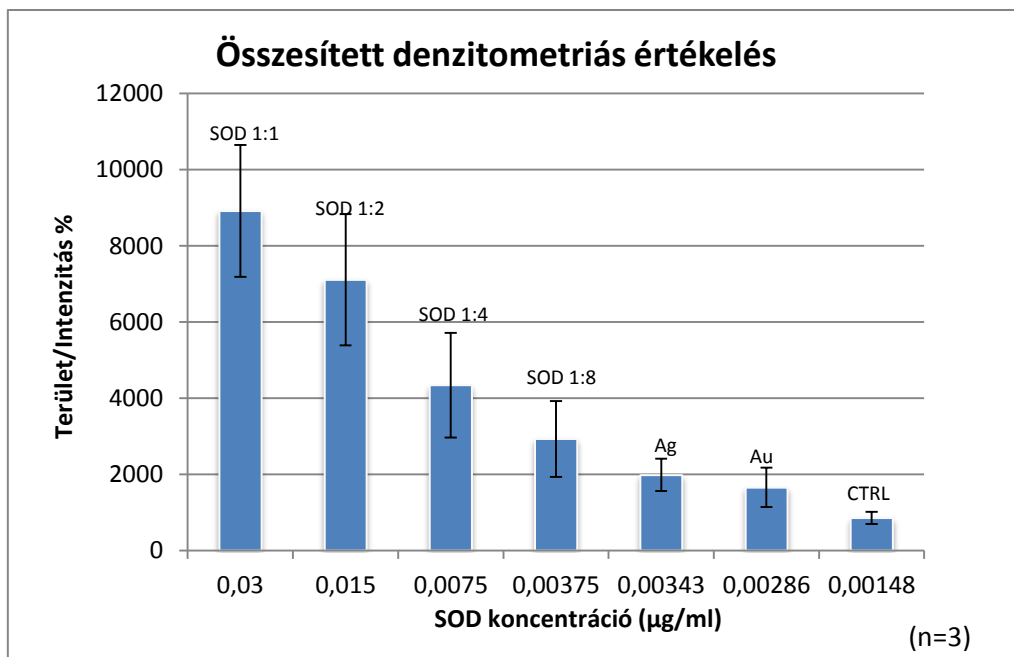
8. ábra. Coelomasejt minták és szuperoxid dizmutáz enzimek zimográfiás képe natív PAGE-val történt elválasztás után (reprezentatív példa). 1. Molekulasúly marker 2. AgNP (5 µg/ml) 3. AuNP (20 µg/ml) 4. H₂O₂ (0,3 µg/ml) 5. CTRL 6. Natív minta puffer 7. SOD 1:8 (0,01875 µg/ml) 8. SOD 1:4 (0,0375 µg/ml) 9. SOD 1:2 (0,075 µg/ml) 10. SOD 1:1 (0,15 µg/ml)

A mintákhoz egy SOD-hígítási sort készítettünk, ehhez hasonlítottuk az enzimaktivitást. Két erőteljesebb sávot detektáltunk a NP kezelt mintákban, 80-60 kDa és 40-30 kDa környékén. A H₂O₂-t pozitív kontrollként alkalmaztuk (8. ábra).



3. grafikon: A 8. ábrán látható SOD zimográfia denzitometriás értékelése

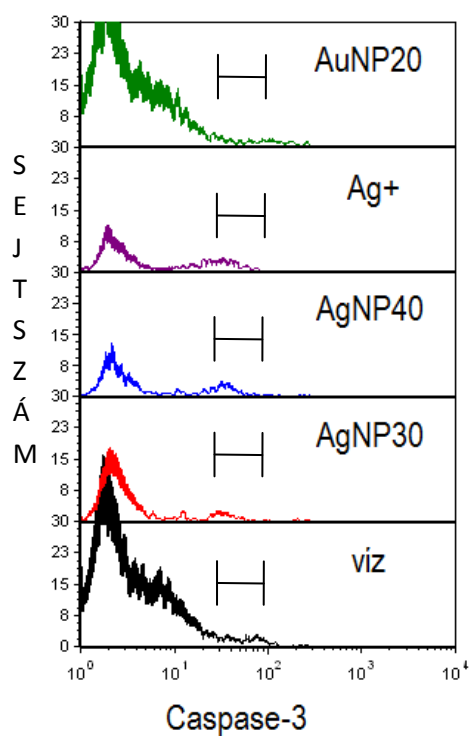
A denzitometriás analízisek (3. és 4. grafikon) alapján megállapítható, hogy az AgNP és AuNP kezelés következtében képződő reaktív oxigén intermedierek hatására nem szignifikáns, de megnövekedett SOD aktivitás detektálható a kezelt sejtekben a kontroll mintákhoz képest.



4. grafikon: Összesített zimográfiák denzitometriás értékelése (n=3, átlag ± SEM).

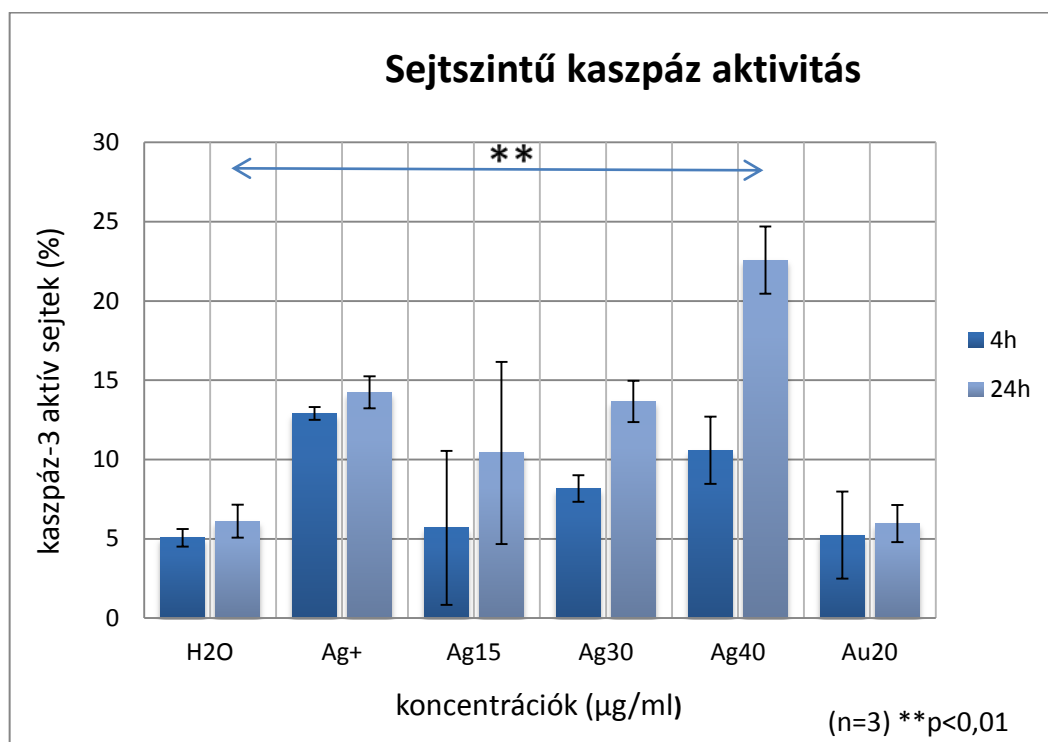
5.4. Sejtszintű kaszpáz aktivitás vizsgálata *E. andrei coelomasejteken*

A mérést kaszpáz 3-szubsztrát fluoreszcens festék alkalmazásával végeztük áramlási citométerrel. A kezeléseket 4 és 24 órás időtartamban hajtottuk végre. A kaszpáz-3 aktivitást hisztogramon ábrázoltuk (9. ábra).



9. ábra: *E. andrei* coelomasejtek kaszpáz aktivitásának kimutatása különböző kezelések (AgNP, AuNP Ag⁺) hatására (A grafikonon a koncentrációk mellett a µg/ml nincs feltüntetve)

A koncentrációk növekedésével a kaspáz-3 aktivitás is megnő, ezt a 10^2 körül lévő emelkedő csúcs mutatja. Az Ag^+ -t pozitív kontrollként használtuk (1,08 $\mu\text{g/ml}$), az alkalmazott koncentrációban jól detektálható volt a kaspáz aktivitás. A negatív kontroll (H_2O) és az AuNP között nem láttunk különbséget (9. ábra).



5. grafikon: Kaspáz-3 aktivitás vizsgálata 4 és 24 órás kezelést követően (*E. andrei*)($n=3$, átlag $\pm$ SEM).

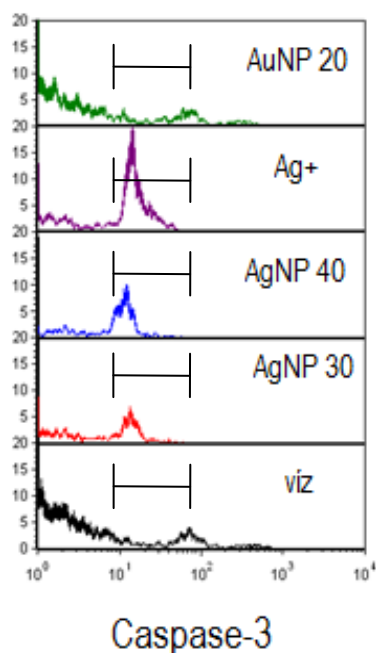
Eredményeink alapján a 4 órás kezelést követően is kimutatható volt a kaspáz-3 aktivitás (5. grafikon). A 24 óra elteltével a 40 $\mu\text{g/ml}$ -es AgNP kezelt sejteknél nőtt meg a leginkább a kaspáz-3 aktivitás, szignifikáns különbséget tapasztaltunk a 24 órás 40 $\mu\text{g/ml}$ -es AgNP kezelt sejtek és a negatív kontroll között. Az alkalmazott AuNP koncentrációnál (20 $\mu\text{g/ml}$) nem tapasztaltunk lényeges változást.

5.5. Sejtszintű kaspáz aktivitás vizsgálata *E. fetida* coelomasejteken

A kezelést azonos koncentrációkkal és inkubációs idővel hajtottuk végre, mint az *E. andrei* coelomasejtek esetében. A nagyobb mértékű kaspáz-3 aktivitást ábrázoltuk hisztogramon, illetve ábrázoltuk a negatív kontroll és az AuNP kezelés eredményét is, a különbségek jobb szemléltetése céljából (10. ábra).

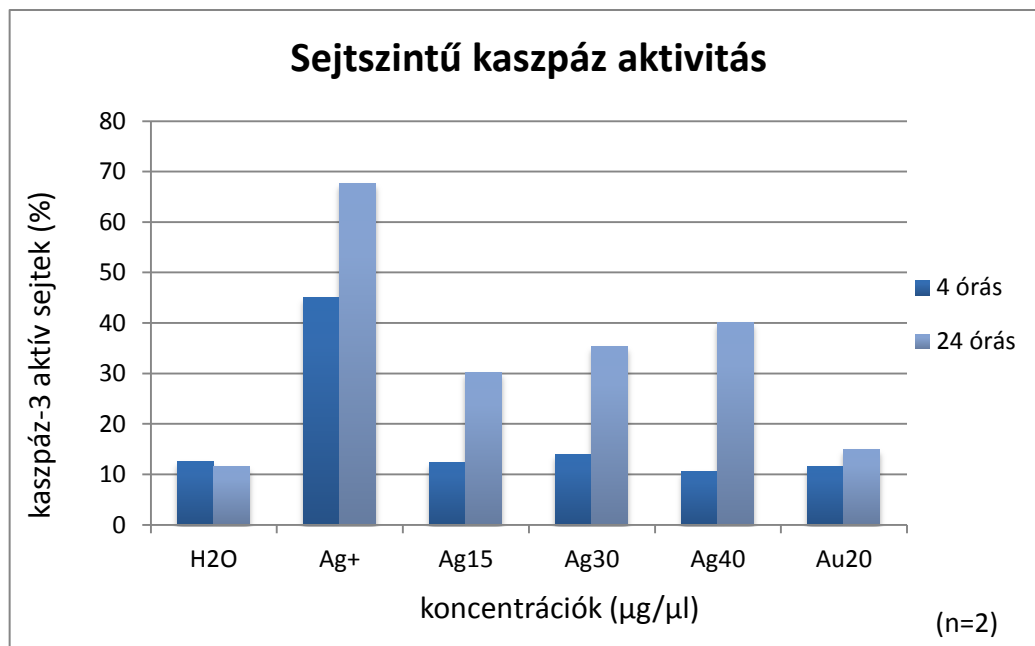
A hisztogramokon látható, hogy a koncentrációk növekedésével a kaspáz-3 aktivitás is emelkedik, ezt a 10^2 körül lévő emelkedő csúcs mutatja, amely a kaspáz 3-fluoreszcenciájával arányos. Hasonlóan a korábban mutatott eredményhez (9. ábra) az Ag^+ *E.*

fetida coelomasejteken is kaszpáz aktivációt indukál. A vizes kontroll és az AuNP között nem figyeltünk meg számottevő különbséget.



10. ábra: *E. fetida* coelomasejtek kaszpáz aktivitásának kimutatása különböző kezelések (AgNP, AuNP Ag+) hatására (a grafikonon a koncentrációk mellett a $\mu\text{g/ml}$ nincs feltüntetve)

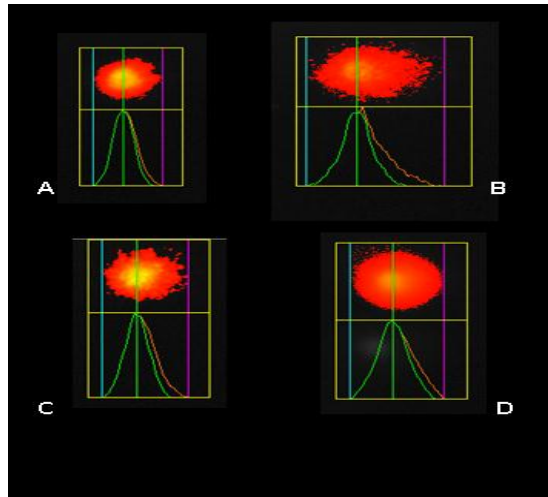
Az értékeket grafikonon ábrázolva (**6. grafikon**) látható a kaszpáz-3 aktív sejtek %-os növekedése. A 4 órás kezelést követően is jelentős mértékű aktivitást tapasztaltunk. Elmondhatjuk, hogy a kaszpáz-3 aktív coelomasejtek mennyisége megduplázódott, mely a 24 órás kezelésnél a legkifejezettebb. Az AgNP kezelések hatására jelentősebb mértékű sejtszintű apoptotikus aktivitást tapasztaltunk az *E. fetida*-nál, mint *E. andrei*-nél.



6. grafikon: Kaspáz-3 aktivitás vizsgálata 4 és 24 órás kezelést követően (*E. fetida*) (n=2)

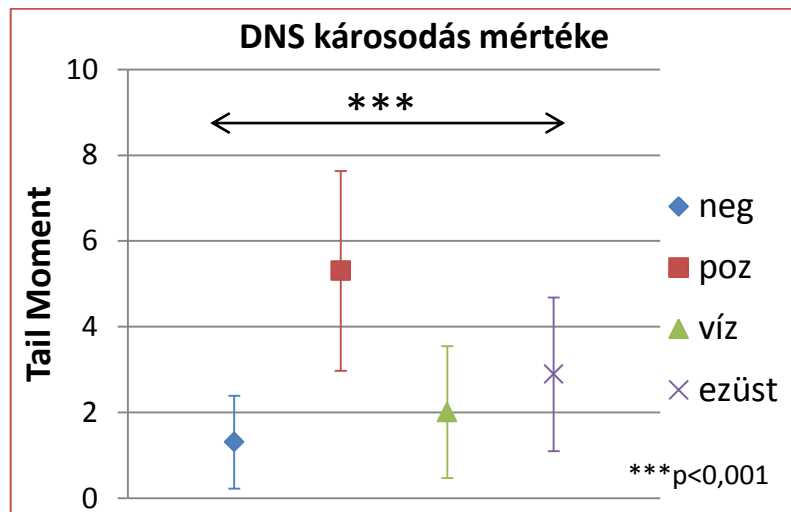
5.6. AgNP kezelt *E. andrei coelomasejtek* DNS károsodása (Comet assay)

A módszer a DNS-ben bekövetkezett szál törések kimutatására alkalmas, a DNS károsodás mértékére is következtethetünk. Emellett előny, hogy egyedi sejtekről kapunk információt, a különböző fokú DNS-károsodásokat is ki tudjuk mutatni. A módszer a folyamat végén kirajzolódó képről kapta a nevét, amely egy üstökösre hasonlít akkor, ha minél nagyobb a károsodás. A 15 µg/ml-es AgNP koncentrációt választottuk ki kezelésként (24 óra), mert az életképesség vizsgálatánál a 15 és 20 µg/ml-es koncentráció között pusztult el a sejtek 50%-a. Emellett készítettünk egy negatív kontrollt (a sejtek 24 órán át médiumban voltak), egy pozitív kontrollt (40 sec-os UV-kezelés) és egy kontrollt. Mindegyik tárgylemezről minimum 50 képet készítettünk, melyeket későbbiekben a program (Comet assay IV. Perceptive Instruments Ltd.) segítségével elemeztünk. Az elemzés során végpontként a fej és a csóva intenzitásának arányát, a tail momentet (TM) határoztuk meg, és végeztük el a statisztikai elemzést.



11. ábra: A) negatív (*médium*)kontroll B) pozitív kontroll (UV) C) H₂O kontroll D) AgNP (15µg/ml)

Az ábrákon minél nagyobb károsodást szenvedett a DNS-állomány, annál nagyobb a csóva, amely az UV-kezelés hatása következtében jól látszik. A negatív kontrolloknál nem láthatunk akkora különbséget. Az AgNP-mal kezelt mintánál szintén láthatunk károsodást, amely kisebb mértékű, mint az UV-kezelés esetén, viszont kifejezettebb, mint a negatív kontrolloknál (11. ábra). Értékeléskor a Tail Moment-et (sejt nagysága és intenzitása) vettük figyelembe, majd a DNS-károsodás mértékét ábrázoltuk (7. grafikon).



7. grafikon. *E. andrei* coelomasejtek DNS-károsodása Comet assay alapján (n=1, ahol az egyes mintákból 50 egyedi sejt analízisét végeztük el).

Elmondhatjuk, hogy szignifikáns különbséget tapasztaltunk a negatív kontrollok és az AgNP-kezelt sejtek között. Az UV-károsodás mértéke jól reprezentálja, hogy a Comet assay megfelelő kivitelezését (7. grafikon).

6. Megbeszélés

A gerinctelen élőlények immunitásának relatív egyszerűsége lehetőséget nyújt arra, hogy egy érzékeny rendszert használjunk a NP-k biológiai rendszerekkel történő összetett kölcsönhatásainak vizsgálatára. Coelomasejteket vizsgálva kimutatták, hogy képesek a NP-ok ($d = 45 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$) felvételére, amely bonyolult energia-függő transzport mechanizmusok révén valósul meg (clatrin,- és caveolin mediált endocitózis útvonal) (CHOLEWA ÉS MTSAL. 2006, VAN DER PLOEG ÉS MTSAL. 2012). *E. fetida* hyalin amoebocitái is képesek az AgNP ($d = 83 \pm 22 \text{ nm}$) akkumulációjára, ugyanezen alpopulációról tudjuk, hogy bekebelezni a baktériumokat is, így a makrofágok gerinctelen megfelelőinek tekinthetjük őket (HAYASHI ÉS MTSAL. 2012, ENGELMANN ÉS MTSAL. 2005). A NP-ok felvételének mechanizmusa a coelomacitáknál még nem teljesen tisztázott. Egyik lehetséges módja a NP-ok felvételének egy másik fagocitózis-útvonal, melyben a scavenger receptorok játszanak szerepet. A scavenger receptorok konzervált sejtfelszíni struktúrákat ismernek fel, a fagocitózis elindításához általában lipidekhez (lipopoliszacharidok és alacsony denzitású lipoproteinek) és polianionokhoz kötődnek. Gerinces (emlős) immunsejteknél ez a felismerési mód is szerepet játszik az immunológiai folyamatokban (KANNO ÉS MTSAL. 2007). Gyűrűsférgeknél eddig még nem találtak scavenger-típusú receptorokat, de más gerinctelen szervezetekben jelen vannak, pl. rovarokban és puhatestűekben már sikerült kimutatni funkcionális scavenger receptor homológokat (FRANC ÉS MTSAL. 1996, LIU ÉS MTSAL. 2011).

A NP-ok szelektív felvétele, döntő többségben valamilyen toxikológiai következménnyel jár. A fém-alapú partikulumok gyors oldódása következtében bioaktív fém-ionok szabadulnak fel, pl. AgNP esetén szabad Ag^+ keletkezik, amely biológiailag sokkal aktívabb, oxidáló tulajdonsága révén könnyebben reakcióba lép a biomolekulákkal (pl. DNS, fehérjék), ROS képződés révén a stressz-útvonalak elindítója (BEER ÉS MTSAL. 2012, YANG ÉS MTSAL. 2011). HAYASHI ÉS MTSAL (2012.) vizsgálták *E. fetida*-nál a sejtszintű ROS-aktivitás növekedését AgNP kezelés hatására és már rövid idejű kezelést követően (1-6 h) is egy erőteljesebb oxidatív stresszválaszt tapasztaltak. A coelomasejtes eredményeket THP-1 (humán akut leukémiás sejtvonal) sejtekkel összehasonlítva, hasonló folyamatot figyeltek meg. Egy másik *in vitro* tanulmányban a C_{60} hatására a coelomasejtek életképessége változatlan maradt, azonban a CCF-1 génexpressziós szintje csökkent, amely egyfajta immunszuppresszióra utalhat (VAN DER PLOEG ÉS MTSAL. 2012).

Munkánk során feltételeztük, hogy a giliszta immunsejtek, mint primér makrofág-szerű sejtek, érzékenyen reagálnak az NP-ok toxikus hatásaira. Célunk a sejtek túlélési és a NP-ok

toxicitási arányának megállapítása volt *E. andrei* és *E. fetida* gilisztafajokon, illetve a két faj közötti különbségek megállapítása a NP kezeléseket követően. A sejtek életképességének vizsgálata során *E. andrei* gilisztafajnál kimutattuk, hogy a 24 órás 15-20 µg/ml-es AgNP-kezelés a coelomasejtek 50%-ának pusztulását okozta (**1. grafikon**), míg *E. fetida*-nál ugyanekkora koncentráció hatására a sejtek több mint 60 %-a elpusztult (**2. grafikon**). Az 50 %-os sejtpusztulás már az 5 µg/ml-es AgNP-kezelés hatására bekövetkezett. Az *E. fetida* coelomasejtek érzékenyebbek, nemcsak a NP kezelésekre, de a negatív kontroll esetén is kétszer akkora sejtpusztulást tapasztaltunk. Eredményeink megegyeztek a szakirodalomban leírtakkal (HAYASHI ÉS ENGELMANN 2013), az AuNP nem befolyásolta lényegesen a sejtek életképességét, a pusztulás nem volt jelentős egyik fajnál sem a kontrollhoz képest. A két NP toxicitásbeli különbségének oka, hogy az AgNP bekerülve a sejtekbe, az ott lévő enzimek hatására ionos formává alakul, míg az AuNP nem, jóval stabilabb szerkezettel rendelkezik.

LAPIED ÉS MTSAL (2011) *L. terrestris* gilisztafajon vizsgálták *in vivo* TiO₂ NP-kezelés hatására bekövetkező apoptotikus válaszreakciót, amely nem a mortalitásban, hanem szövetszinten nyilvánult meg. Kísérleteink során a NP-kezelés hatására bekövetkező sejtszintű apoptotikus aktivitást vizsgáltuk. A két faj coelomasejtjei közötti érzékenységbeli különbséget a kaszpáz-3 aktivitás vizsgálata is megmutatta. *E. andrei* coelomasejtekénél szignifikáns különbséget tapasztaltunk a 24 órás 40 µg/ml-es AgNP-kezelés és a 24 órás kontroll minta között (**p<0,01, n=3), *E. fetida* esetén a kaszpáz-3 aktív sejtek %-os aránya egyaránt megduplázódott a 4, -és 24 órás kezeléseket követően (**5 és 6. grafikon**).

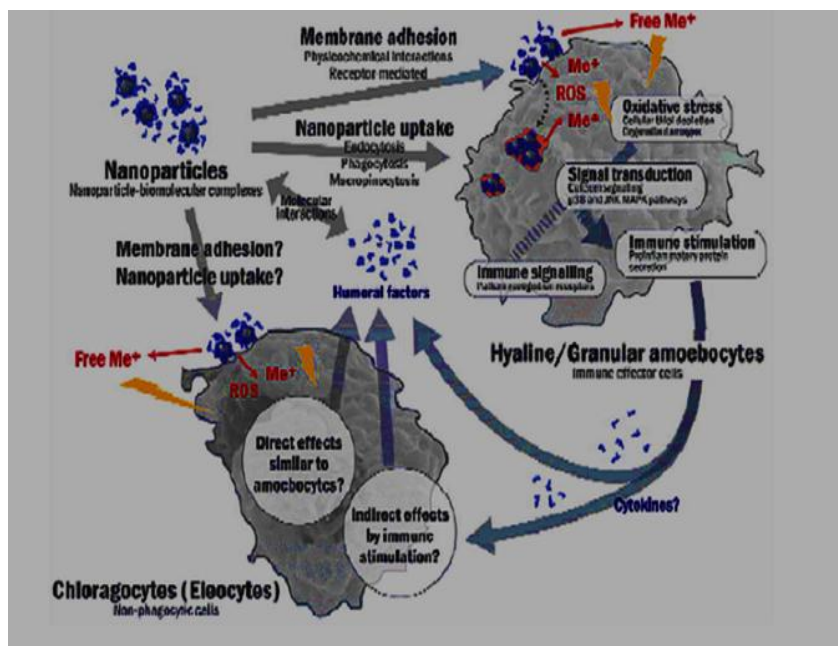
Előzetes szakirodalmi adatok alapján a sejtbe bekerült NP-ok hatására a megemelkedett ROS-szint miatt a SOD-aktivitás fokozódik (HAYASHI ÉS MTSAL 2012). Különböző koncentrációkat választottunk ki *E. andrei* fajnál az életképesség vizsgálata alapján a SOD-aktivitás kimutatásához. Elmondhatjuk, hogy már az 5 µg/ml-es AgNP-kezelés következtében nagyobb mértékben volt kimutatható a SOD expresszió, mint a 20 µg/ml-es AuNP-kezelésnél (**4. grafikon**). Előzetes tanulmányaink alapján tudjuk, hogy gilisztánál már sikerült kimutatni a Cu/Zn SOD jelenlétét monoklonális ellenanyaggal (ENGELMANN ÉS MTSAL 2002), ennek molekulatömege 32,5 kDa, amely egy monomer. A gyári SOD, melyből a hígítási sor készítettük, valószínűleg dimer állapotban volt jelen, amely e kezelt mintáknál a lízis következtében válhatott monomerré.

Az SOD enzim aktivitás vizsgálatának eredményeiből feltételeztük, hogy a NP kezelés következtében DNS-károsodás léphet fel (reaktív oxigén intermedierek célmolekulája lehet a

DNS). GUPTA ÉS MTSAL. (2014) ZnO NP (50 és 100 nm) toxikus hatását és a DNS-károsodás mértékét vizsgálták *E. fetida* coelomasejteken, koncentrációfüggő toxicitást tapasztaltak, amely korrelált a DNS-károsodás mértékével. Comet assay-vel a károsodás mértéke az általuk alkalmazott mindkét méretű NP esetén már 3µg/ml esetén kimutatható volt. Kísérletünk kivitelezésekor szintén ezt a módszert alkalmaztuk a DNS-károsodás becslésére *E. andrei* coelomasejteken. A 15 µg/ml-es AgNP-kezelés hatására szignifikáns különbséget tapasztaltunk a negatív kontroll és az AgNP- kezelt sejtek, illetve a negatív kontroll és az AgNP-kezelt sejtek között (7. grafikon).

További fontos kérdés, hogy a NP hogyan befolyásolja a coelomasejtek jelátviteli útvonalait. Egymással párhuzamosan több stressz jelátviteli (MAPK) útvonal is aktiválódhat AgNP vagy más NP hatására, amely kapcsolatot alakít ki az oxidatív stressz és az immunválasz létrejötte között. A MAPK-család foszforilációs folyamata még nem tisztázott coelomasejteken, azonban a *Mytilus* haemocytaít *in vitro* NP-okkal vizsgálva a MAPK-utak (p38 és a JNK) tagjainak gyors aktivációja indult be (CANESI ÉS MTSAL. 2008, 2010). Hasonlóan a *Mytilus*-hoz, egy másik édesvízi kagylónál (*Dreissena sp.*) is tanulmányozták a TiO₂ NP akkumulációját, amely a haemocyta csökkent fagocita aktivitását okozta, illetve a MAPK-családba tartozó ERK és p38 jelátviteli utakat aktiválta (COULEAU ÉS MTSAL. 2012). *E. fetida* amoebocyta populációknál kimutatták, hogy az aktivációhoz kalciumra van szükség, így lehet, hogy ugyanazon kalcium-jelátviteli utaknak vannak birtokában, mint a magasabbrendű szervezetek, melyek összekötik a stressz válaszokat az immunrendszer aktivációjával (OPPER ÉS MTSAL 2010).

A NP-kal kapcsolatos immuntoxikológiai kutatásokban a termelt (és a coelomafolyadékban lokalizálódó) humorális komponensek vizsgálata is egy újabb érdekes terület lehet. A fagociták citokin szekréciója a sejtek válasza a sejtbe kerülő NP-ok hatására. Direkt bizonyítékokkal azonban nem rendelkezünk, hogy gyűrűsférgekben írtak-e le már konzervált vagy újszerű citokineket. Összehasonlításképpen más gerinctelen szervezeteknél (főként az ízeltlábúaknál), már elég adat áll rendelkezésünkre a citokin-mediálta immunfunkciókról (MALAGOLI 2010; MALAGOLI ÉS MTSAL. 2012; SÖDERHÄLL ÉS MTSAL. 2005). Gyűrűsférgekben a citokinek létezését és konzerváltságát nehéz bizonyítani, azonban korábban megfigyelték egy emlős TNF-α ellen termelt monoklonális ellenanyag pozitív reakcióját a coelomasejteken (ENGELMANN ÉS MTSAL. 2002).



12. ábra: A NP-ok megjelenése következtében beinduló, coelomasejtek által közvetített immunológiai folyamatok (sematikus ábra). A gyűrűsférgek immunrendszeréről elmondható, hogy bonyolult celluláris és humorális mechanizmusok összege, amelynek során fontos szerepet tölt be a coelomasejtek fagocitot és citotoxikus képessége, de a folyamatok egy része a coelomafolyadékban található faktorok és a coelomasejtek által termelt molekulák által szabályozott lépésekből áll (Me^+ : fémion, ROS: reaktív oxigén intermedier)(átvéve HAYASHI ÉS ENGELMANN. 2013. publikációjából).

A gyűrűsférgek coelomafolyadékáról azt is feltételezik, hogy immunológiai funkcióját tekintve ekvivalens az emlősök vérplazmájával, mindkettő fehérje gazdag, főként chloragocytáknak (mozgóképes és szesszilis forma) lehet szerepük a természetes stresszorok elleni humorális immunválasz kialakításában (MOLNÁR ÉS MTSAL. 2012).

Jelenleg az *E. andrei* és *E. fetida* külön fajként szerepelnek az irodalomban (DVOŘÁK ÉS MTSAL. 2013). A NP-ra adott toxikológiai válaszban fajok közötti különbségeket tapasztaltunk. Ez részben adódhat abból, hogy bár a két faj hasonló ökológiai szerepet tölt be, azonban az *E. andrei* inkább a laboratóriumokban megtalálható faj, míg az *E. fetida* a laboratóriumokban kevésbé, inkább természetes közegben fordul elő. Feltételezésünk szerint az *E. andrei* jobban alkalmazkodott a laboratóriumi körülményekhez, ezáltal kevésbé érzékeny a különböző kontaminációból adódó toxikológiai hatásokra.

További terveink között szerepel a NP-k által kiváltott sejtszintű ROS aktivitás vizsgálata áramlási citometriával, illetve a coelomasejtek megváltozott génexpressziós mintázatának (mintázatfelismerő receptorok, humorális immunkomponensek, oxidatív stressz molekulák) mérése valós-idejű PCR segítségével.

7. Összegzés

Az *Eisenia* gyűrűsféreg fajokat elsősorban ökotoxikológiai kísérletekben használják, mint modellszervezeteket, egyre elterjedtebbek azonban a nanotoxikológiai vizsgálatokban is. Kiterjedt, részletes tanulmányok hiányában kevés ismeret áll a rendelkezésünkre, hogy a NP-k milyen kockázati tényezőt jelentenek szűkebb értelemben a közegészségre, tágabb értelemben pedig az ökoszisztémára.

1. Vizsgálataink során különböző koncentrációjú és időtartamú *in vitro* AgNP ill. AuNP kezeléseket végeztünk *E. andrei* és *E. fetida* coelomasejteken. Megállapítottuk, hogy az AgNP mindkét fajnál dózisfüggő sejtpusztulást okozott. Az *E. andrei* esetében 10-15 µg/ml AgNP, az *E. fetida*-nál pedig 5µg/ml mutatott erőteljesebb toxicitást. Az AuNP egyik fajnál sem okozott lényeges változást a kontroll sejtekhez képest.
2. A NP által kiváltott reaktív oxigén intermedierek termelését szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim zimográfia segítségével vizsgáltuk *E. andrei* coelomasejteken. Mindkét NP kezelt mintánál erőteljesebb enzimaktivitást tapasztaltunk, mint a kontroll minták esetében.
3. Az NP által kiváltott sejtpusztulás mechanizmusát sejtszintű kaszpáz 3 aktivitás vizsgálatával végeztük, melyre az *E. fetida* coelomasejtek magasabb, míg az *E. andrei* coelomasejtek alacsonyabb kaszpáz aktivitással válaszoltak.
4. A DNS károsodás közvetlen becslését Comet-assay-vel *E. andrei* coelomasejteken végeztük el.
5. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy *E. fetida* gilisztafajból származó coelomasejtek érzékenyebben reagálnak a NP kezelésekre, mint *E. andrei* coelomasejtek.

A gerinctelen modellszervezetekkel végzett kutatások rávilágíthatnak arra, hogy milyen felismerési,- és sejten belüli jelátviteli mechanizmusok indulhatnak el a NP-ok megjelenésekor, illetve a sejtekbe kerülésekor, azonban még számos megválaszolatlan kérdésnek vagyunk birtokában. Elmondhatjuk, hogy az általunk alkalmazott *Eisenia* fajokból származó coelomasejtek egy érzékeny modellrendszernek bizonyultak a NP-ok és biológiai rendszerek komplex interakciójának vizsgálatakor.

8. Irodalomjegyzék

- ADAMOWICZ A (2005): Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes. *Tissue Cell* 37 (2):125-133.
- BEER C, FOLDBJERG R, HAYASHI Y, SUTHERLAND DS, AUTRUP H. (2012): Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? *Toxicol. Lett.* 208: 286-292.
- BILEJ M, BRYŠ L, BESCHIN A, LUCAS R, VERCAUTEREN E, HANUŠOVÁ R, DE BAETSELIER P (1995) Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia fetida* earthworms. *Immunol Lett* 45 (1-2):123-128.
- BILEJ M, DE BAETSELIER P, BESCHIN A(2000) Antimicrobial defense of the earthworm. *Folia Microbiol* 45 (4):283-300.
- CALISI A, LIONETTO GM, SCHETTINO T (2009):Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotox Env Saf* 72 (5):1369-1377.
- CANESI L, CIACCI C, BETTI M, FABBRI R, CANONICO B, FANTINATI A(2008): Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environ. Int.* 34: 1114-1119
- CANESI L, CIACCI C, VALLOTTO D, GALLO G, MARCOMINI A, POJANA G (2010): In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60) fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes *Aquatic Toxicology* 96:151–158.
- CHOLEWA J, FEENEY GP, O'REILLY M, STÜRZENBAUM SR, MORGAN AJ, PŁYTYCZ B. (2006): Autofluorescence in leucocytes of some earthworm species. *Folia histochemica et cytobiologica*. 44: 65-71.
- COOPER EL, KAUSCHKE E, COSSARIZZA A (2002) Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *BioEssays* 24 (4):319-333.
- COUTRIS C, HERTEL-AAS T, LAPIED E, JONER EJ, OUGHTON DH (2012): Bioavailability of cobalt and silver nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Nanotoxicology* 6: 186–195.
- COULEAU N, TECHER D, PAGNOUT C, JOMINI S, FOUCAUD L, LAVAL-GILLY P(2012):Hemocyte responses of *Dreissena polymorpha* following a short-term *in vivo* exposure to titanium dioxide nanoparticles: Preliminary investigations. *Sci. Total Environ.* 438: 490-497.
- DEMUYNCK S,GRUMIAUX F,MOTTIER V, SCHIKORSKI D,LEMIÈRE S,LEPRÊTRE A (2007): Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Comp Biochem Physiol* 145C (4): 658-668.
- DVOŘÁK J, MANČIKOVÁ V, PIŽL V, SILEROVÁ M, ROUBALOVÁ R, SKANTA F, PROCHÁZKOVÁ P, BILEJ M (2013): Microbial environment affects innate immunity in two closely related earthworm species *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida*. *PLoS One* 8(11): e79257.

- ENGELMANN P, PÁL J, BERKI T, COOPER EL, NÉMETH P (2002): Earthworm leukocytes react with different mammalian antigen-specific monoclonal antibodies. *Zoology* 105 (3): 257-265.
- ENGELMANN P, PÁLINKÁS L, COOPER EL, NÉMETH P. (2005): Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 599-614.
- ENGELMANN P, COOPER EL, OPPER B, NÉMETH P (2011): Earthworm Innate Immune System. In: Karaca A (ed): *Biology of earthworms*, Springer Verlag 24: 229-245.
- FRANC NC, DIMARCQ J-L, LAGUEUX M, HOFFMANN J, EZEKOWITZ RAB (1996): Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*. 4: 431-443.
- GUPTA S, KUSHWAH T YADAV S (2014): Earthworm coelomocytes as nanoscavenger of ZnO NPs. *Nanoscale Research Letters* 9:259.
- HANSEN S, MICHELSON E, KAMPER A, BORLING P, STUER-LAURIDSEN F, BAUN A (2008): Categorization framework to aid exposure assessment of nanomaterials in consumer products. *Ecotoxicology* 17: 438-447.
- HAYASHI Y, ENGELMANN P, FOLDBJERG R, SZABÓ M, SOMOGYI I, POLLÁK E, MOLNÁR L, AUTRUP H, SUTHERLAND DS, SCOTT-FORDSMAND J, HECKMANN LH (2012): Earthworms and humans in vitro: Characterizing evolutionarily conserved stress and immune responses to silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 46:4166–4173.
- HAYASHI Y, ENGELMANN P (2013): Earthworm's immunity in the nanomaterial world: new room, future challenges *Inv. Surv. Jour.* 10: 69-76.
- HECKMANN LH, HOVGGAARD MB, SUTHERLAND DS, AUTRUP H, BESENBACHER F, SCOTT-FORDSMAND JJ (2011): Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida* *Ecotoxicology*.20:226–233.
- HU C, LI M, CUI YB, LI DS, CHEN J, YANG LY (2010): Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol. Biochem.* 42: 586–591.
- HU C, LI M, WANG W, CUI Y, CHEN J, YANG L (2012): Ecotoxicity of silver nanoparticles on earthworm *Eisenia fetida*: Responses of the antioxidant system, acid phosphatase and ATPase. *Toxicol. Environ. Chem.* 94: 732-741.
- KANNO S, FURUYAMA A, HIRANO S. (2007): A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 97: 398-406.
- KUREK A, HOMA J, KAUSCHKE E, PLYTYCZ B (2007:) Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *Eur J Soil Biol* 43(1):121-126.

- KWAK JIL, LEE WM, KIM SW AND AN YJ (2014): Interaction of citrate-coated silver nanoparticles with earthworm coelomic fluid and related cytotoxicity in *Eisenia andrei*. *J. Appl. Toxicol.* 34: 1145–1154.
- LAPIED E, MOUDILOU E, EXBRAYAT J-M, OUGHTON DH, JONER EJ (2010): Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Nanomedicine* 5: 975–984.
- LAPIED E, NAHMANI JY, MOUDILOU E, CHAURAND P, LABILLE J, ROSE J, EXBRAYAT JM, OUGHTON DH, JONER E (2011): Ecotoxicological effects of an aged TiO₂ nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. *Env. Int.* 37(6): 1105-1110.
- LASSALLE F, LASSEGUES M, ROCH P (1988): Protein-analysis of earthworm celomic fluid IV. Evidence, activity induction and purification of *Eisenia fetida andrei* lysozyme (Annelidae). *Comp Biochem Physiol* 91B (1):187-192.
- LIU L, YANG J, QIU L, WANG L, ZHANG H, WANG M(2011): A novel scavenger receptor-cysteine-rich (SRCR) domain containing scavenger receptor identified from mollusk mediated PAMP recognition and binding. *Dev. Comp. Immunol.* 35: 227-239.
- MALAGOLI D (2010): Cytokine network in invertebrates: The very next phase of comparative immunology. *Invert. Surv. J.* 7: 146-148.
- MALAGOLI D, ACCORSI A, SACCHI S, BASILE V, MANDRIOLI M, PINTI M(2012): *Drosophila* helical factor is an inducible protein acting as an immune-regulated cytokine in S2 cells. *Cytokine.* 58: 280-286.
- MAURER-JONES MA, BANTZ KC, LOVE SA, MARQUIS BJ, HAYNES CL (2009): Toxicity of therapeutic nanoparticles. *Nanomedicine.* 4:219–241.
- MILOCHAU A, LASSEGUES M, VALEMBOIS P (1997): Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochim Biophys Acta* 1337 (1):123-132.
- MOLNÁR L, ENGELMANN P, SOMOGYI I, MÁCSIK LL, POLLÁK E (2012): Cold-stress induced formation of calcium and phosphorous rich chloragocyte granules (chloragosomes) in the earthworm *Eisenia fetida*. *Comp. Biochem. Physiol.* 163A: 199-209.
- OPPER B, NÉMETH P, ENGELMANN P. (2010): Calcium is required for coelomocyte activation in earthworms. *Mol. Immunol.* 47: 2047-2056.
- ROBICHAUD CO, UYAR AE, DARBY MR, ZUCKER LG, WIESNER MR (2009): Estimates of Upper Bounds and Trends in Nano-TiO₂ Production As a Basis for Exposure Assessment *Environ. Sci. Technol.* 43:4227–4233.

- ROCH P, VALEEMBOIS P, DAVANT N, LASSEGUES M (1981): Protein-analysis of earthworm celomic fluid. 2. isolation and biochemical-characterization of the *Eisenia-fetida-andrei* factor (EFAF). *Comp Biochem Physiol* 69B (4):829-836.
- SÖDERHÄLL I, KIM Y-A, JIRAVANICHPAISAL P, LEE S-Y, SÖDERHÄLL K(2005): An ancient role for a prokineticin domain in invertebrate hematopoiesis. *J Immunol.* 174: 6153-6160.
- STEIN EA., AVTALION RR, COOPER EL (1977): The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Morphology and phagocytic properties. *J. Morphol.* 153: 467-476.
- STEIN EA, COOPER EL (1978) Cytochemical observation of coelomocytes from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Histochem. J.* 10: 657-678.
- STEIN EA, COOPER EL (1988): In vitro agglutinin production by earthworm leukocytes. *Dev Comp Immunol* 12 (3):531-547.
- STENSBERG MC, WEI Q, McLAMORE ES, PORTERFIELD DM, WEI A, SEPULVEDA MS (2011): Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging *Nanomedicine.* 6:879–898.
- TSYUSKO OV, HARDAS SS, SHOULTS-WILSON WA, STARNES CP, JOICE G, BUTTERFIELD DA, UNRINE JM (2012): Short-term molecular-level effects of silver nanoparticle exposure on the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 171: 249–255.
- VALEEMBOIS P, ROCH P, LASSEGUES M, CASSAND P (1982): Antibacterial activity of the hemolytic system from the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *J Invertebr Pathol* 40 (1):21-27.
- VALEEMBOIS P, SEYMOUR J, ROCH P (1991): Evidence and cellular localization of an oxidative activity in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *J Invertebr Pathol* 57 (2): 177–183.
- VAN DER PLOEG MJC, BAVECO JM, VAN DER HOUT A, BAKKER R, RIETJENS IMCM, VAN DEN BRINK NW (2011): Effects of C60 nanoparticle exposure on earthworms (*Lumbricus rubellus*) and implications for population dynamics. *Environ. Pollut.* 159: 198–203.
- UNRINE JM, HUNYADI SE, TSYUSKO OV, RAO W, SHOULTS-WILSON WA, BERTSCH PM (2010): Evidence for bioavailability of au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). *Environ. Sci. Technol.* 44: 8308-8313.
- YANG X, GONDIKAS AP, MARINAKOS SM, AUFFAN M, LIU J, HSU-KIM H(2011): Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* 46: 1119-1127.

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Engelmann Péternek, Dr. Gerencsér Gellértnek, a PTE ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézet munkatársának, és a PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden dolgozójának a dolgozat megírásához nyújtott segítségüket.